

Methoden zur Auffindung von Proteasen, die spezifisch membrangebundene Substratspalten

Patent number: DE19920514
Publication date: 2000-11-16
Inventor: HAASS CHRISTIAN (DE); PESOLD BRIGITTE (DE); STEINER HARALD (DE)
Applicant: BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA (DE)
Classification:
- international: C07K14/39; C07K14/435; C12N9/14; C12N15/62; C12N15/79
- european: C07K14/47A3; C07K14/39; C12Q1/37
Application number: DE19991020514 19990505
Priority number(s): DE19991020514 19990505

Also published as:

WO0068416 (A)
WO0068416 (A)
EP1177313 (A3)
EP1177313 (A2)
CA2370212 (A1)

Abstract of DE19920514

The invention relates to a method for localising proteases which split substrates linked by a membrane. The invention also relates to the recombinant fusion proteins which are necessary for said method.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 20 514 A 1**

⑦ Aktenzeichen: 199 20 514.0
② Anmeldetag: 5. 5. 1999
④ Offenlegungstag: 16. 11. 2000

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/39
C 07 K 14/435
C 12 N 9/14
C 12 N 15/62
C 12 N 15/79

DE 199 20 514 A 1

⑦ Anmelder:
Boehringer Ingelheim Pharma KG, 55218
Ingelheim, DE

⑦ Erfinder:
Haass, Christian, Prof. Dr., 82057 Icking, DE; Steiner,
Harald, Dr.rer.nat., 80339 München, DE; Pesold,
Brigitte, 69115 Heidelberg, DE

⑤ Entgegenhaltungen:
WO 98 13 488

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Methoden zur Auffindung von Proteasen, die spezifisch membrangebundene Substrate spalten

⑤ Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten sowie die dafür notwendigen rekombinanten Fusionsproteine.

DE 199 20 514 A 1

Beschreibung

Technisches Gebiet

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten sowie die dafür notwendigen rekombinanten Fusionsproteine.

Stand der Technik

- 10 Proteasen spielen eine wichtige Rolle für viele physiologische Prozesse wie beispielsweise die Transkription, Apoptose, Entwicklung und Signaltransduktion. (Whiteside, S. T. et al. J. Biol. Chem., 269, 1994: 27059). Auch ist bekannt, daß Proteasen eine Schlüsselrolle in einer ganzen Reihe von Erkrankungen einnehmen, wie beispielsweise bei den neurodegenerativen Krankheiten, die zum Beispiel auch die Alzheimersche Krankheit beim Menschen umfassen. Die in solchen Krankheitsbildern involvierten bekannten und noch unbekannten Proteasen stellen einen wichtigen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren dar.
- 15 Das Auffinden von Proteasen und der Nachweis ihrer proteolytischen Aktivität und Spezifität basiert auf dem Nachweis und der Charakterisierung eines Spaltprodukts. Es sei hier auf die Verfahren von Smith und Kohorn (Smith, T. A. und Kohorn, B. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1991: 5159) und Dasmahapatra et al. (Dasmahapatra, B. et al. PNAS 89(9), 1992: 4159-4162) verwiesen.
- 20 Smith und Kohorn beschreiben ein Verfahren zur Auffindung der cDNA's eukaryontischer Proteasen, die eine vorgegebene Aminosäuresequenz spalten. Zum Nachweis einer spezifischen proteolytischen Aktivität wurde hier ein Fusionsprotein aus einer bekannten Proteasespaltsequenz und dem Transkriptionsfaktor GAL4 sowie die dafür spezifische Protease selbst rekombinant in Hefe exprimiert. Die Spaltung der Proteasespaltsequenz durch die spezifische Protease trennt die transkriptionsaktivierende Domäne von der DNA-bindenden Domäne, die in diesem Fusionsprotein durch die Spaltsequenz funktional verbunden waren. Der Nachweis der spezifischen Proteasereaktion erfolgt durch die Inaktivierung der Gal4-Aktivität.
- 25 Auch Dasmahapatra et al. verwenden das GAL4-Reportersystem in identischer Weise durch Insertion einer autolytisch spaltenden Protease zwischen den funktionellen Anteilen des GAL4-Reportersystems. Der Verlust der Gal4-Aktivität dient auch hier zum Nachweis der autoproteolytischen Aktivität der Insertionssequenz.
- 30 Beide Verfahren sind beschränkt auf das Auffinden cytosolisch lokalisierter bzw. cytosolisch spaltender Proteasen, da die beschriebenen rekombinanten Substrate bzw. Fusionsproteine cytosolisch lokalisiert sind.
- Manche physiologischen Vorgänge, aber auch einige pathologische Prozesse wie die oben bereits erwähnten neurologischen Erkrankungen basieren auf der proteolytischen Spaltung membrangebundener Substrate. Die Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung, der am häufigsten vorkommenden neurodegenerativen Erkrankung am Menschen, ist mit der proteolytischen Aktivierung des neurotoxischen Amyloid β -peptids ($A\beta$) assoziiert und involviert mindestens zwei proteolytische Aktivitäten, die beide ein membrangebundenes Substrat voraussetzen (Haass, C. and Selkoe, D. J. Cell, 75, 1993: 1039; Selkoe, D. J. J. Biol. Chem., 271, 18295; Citron M. et al. Neuron, 14, 1995: 661; Tischer, E. and Cordell, B. J. Biol. Chem., 271, 1996: 21914). Während die β -Sekretase im Lumen von Membrankompartimenten den N-Terminus generiert, spaltet die γ -Sekretase den C-Terminus der Amyloiddomäne (Haass, C. et al. Nature, 359, 1992: 325; M. Shoji et al. Science, 258, 1992: 126; Busciglio, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993: 2092). Auch die zwei in die Alzheimersche Pathologie involvierten homologen Presenilinproteine (PS), die wahrscheinlich die γ -Sekretase aktivieren (DeStrooper, B. et al. Nature, 391, 1998: 391), sind membrangebunden und werden durch noch unbekannte Presenilinasen und Caspasen proteolytisch prozessiert (Thinakaran, G. et al. Neuron, 17, 1996: 181; Podlisny, M. et al. Neurobiology of Disease, 3, 1997: 325; Mercken, M. et al. FEBS Letters, 389, 1996: 297; Tomita, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1997: 2025; Capell, A. et al. J. Biol. Chem., 273, 1998: 32050; Thinakaran, G. et al. Neurobiol. Disease, 4, 1998: 438; Yu, G. et al. J. Biol. Chem. 273: 1998: 16740; Kim, T.-W. et al. Science, 277, 1997: 373; Loetscher, H. et al. Biol. Chem. 272, 1997: 20655; Vito, P. et al. J. Biol. Chem. 272, 1997: 28315; Grünberg, J. et al. Biochemistry, 37, 1998: 2263).
- 45 Derzeit ist es mit den Methoden des Standes der Technik nicht möglich, Proteine selbst bekannter proteolytischer Aktivität von membrangebundenen Substraten zu identifizieren und isolieren. Die Identifizierung solcher Proteasen, wie beispielsweise der oben genannten γ -Sekretase, der Presenilinasen und Caspasen würde erheblich zum molekularen Verständnis pathologischer Erkrankungen beitragen und die Entwicklung hochspezifischer Proteaseinhibitoren zur Therapie entscheidend voranbringen. Die Reinigung dieser bekannten proteolytischen Aktivitäten durch konventionelle Methoden unter Verwendung löslicher Substrate ist sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, da diese Proteasen membrangebundene Substrate zur Erkennung ihrer Zielsequenz (Citron M. et al. Neuron, 14, 1995: 661; Tischer, E. and Cordell, B. J. Biol. Chem., 271, 1996: 219145).
- 50 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher das Bereitstellen eines Verfahrens zum Auffinden von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten.

60 Darstellung der Erfindung und bevorzugter Ausführungsformen

Die der Anmeldung zugrundeliegende Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung im Rahmen der Beschreibung und der Patentansprüche gelöst werden, indem ein Verfahren zum Auffinden von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten, zur Verfügung gestellt wird, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

- 65 I. ein rekombinantes Fusionsprotein, bestehend aus mindestens einem Reporteranteil und einer Proteasespaltsequenz in einem geeigneten Zellsystem exprimiert wird, das mit einer Membran assoziiert und
- II. ein weiteres Protein in dem gleichen Zellsystem exprimiert wird, und

III. das Vorhandensein des abgespaltenen Reporteranteils nachgewiesen wird.

Eine Protease im Sinne der Erfindung ist jedes Protein oder Makromolekül mit einem Peptidanteil, das in der Lage ist, Peptidbindungen zu spalten.

Unter einem Fusionsprotein soll der Fachmann ein Protein verstehen, das rekombinant in einem geeigneten Zellsystem exprimiert wird und mindestens zwei funktionelle Anteile aufweist, einen Reporteranteil und eine Proteasespaltsequenz. 5

Unter membranassoziierten Fusionsproteinen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Proteine zu verstehen, die in räumlicher Nähe mit einer beliebigen Membran innerhalb der Zelle oder der Zellmembran stehen. Die Membranen der Zelle und Zellorganellen bzw. Zellkompartimente sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Zellbiologie bestens bekannt und werden hier nicht im einzelnen aufgezählt. 10

Unter einem weiteren Protein, das neben dem erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsprotein im gleichen Zellsystem exprimiert wird, ist im Sinne der Erfindung sowohl ein endogen vorhandenes Protein als auch ein rekombinantes Protein oder das Fragment eines solchen endogenen oder rekombinanten Proteins zu verstehen, von dem vermutet wird, das dieses eine proteolytische Aktivität aufweist. 15

Bei der Proteasespaltsequenz handelt es sich um eine Peptidsequenz, die als durch Proteasen spaltbare Sequenz bekannt ist oder als solche vermutet wird.

Für die Lokalisation des rekombinanten Fusionsproteins ergeben sich drei Möglichkeiten. Zum einen kann die membranassoziierte Spaltsequenz vollständig oder teilweise innerhalb der Membran lokalisiert sein. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Erfindung daher Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz ganz oder teilweise innerhalb der Zellmembran lokalisiert ist. 20

Neben der seltenen jedoch nicht auszuschließenden Möglichkeit, daß die membranassoziierte Spaltsequenz außerhalb der Zellmembran in das extrazelluläre Medium ragt, besteht auch die Möglichkeit, daß die membranassoziierte Proteasespaltsequenz teilweise oder ganz im Zytosol lokalisiert ist. Selbst ein solches membranassoziiertes Proteasesubstrat, das vollständig im Zytosol lokalisiert ist, kann bedingt durch die unmittelbare räumliche Nähe von Membranen nicht als zytosolisch, sondern muß als membranassoziiert angesehen werden, da die Zugänglichkeit dieses Substrats für eine rein zytosolisch spaltende Protease räumlich in erheblichem Maße eingeschränkt ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Erfindung daher Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz ganz oder teilweise innerhalb des Zytosols lokalisiert ist. 25

Wenn weder die Proteasespaltsequenz noch der Reporteranteil, noch ein anderer Teil des Fusionsproteins eine Membranassoziation ermöglichen, so kann das Fusionsprotein mit einem zusätzlichen funktionellen Ankeranteil versehen werden. Daher umfasst die Erfindung in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform auch Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das Fusionsprotein durch einen zusätzlichen Ankeranteil in der Membran verankert ist. 30

Es ist auch möglich, das Fusionsprotein durch eine entsprechende geeignete Spaltsequenz in der Membran zu verankern. Bei membranständigen natürlichen Proteasesubstraten ist eine solche Eigenschaft zu erwarten. Beispielsweise sei hier die Spaltsequenz genannt, die durch die γ -Sekretase gespalten wird. Daher umfasst die Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform auch Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das Fusionsprotein durch die Proteasespaltsequenz selbst in der Membran verankert ist. 35

Das rekombinante Fusionsprotein im Sinne der Erfindung kann neben den funktionellen Anteilen wie der Spaltsequenz, der Reportersequenz und optional einer zusätzlichen Ankersequenz auch reine Abstandshalter beinhalten. Bei Abstandshaltern im Sinne des Patents handelt es sich um Peptide, die funktionelle Anteile voneinander trennen beziehungsweise verbinden. Ihr Nutzen besteht in der räumlichen Trennung der funktionellen Anteile, die in manchen Fällen erst das uneingeschränkte Ausüben deren Funktion ermöglicht. Daher umfasst die Anmeldung in einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz und/oder der Reporteranteil und/oder der Ankeranteil des Fusionsproteins durch einen Abstandshalter verbunden sind. 40

Auch ist es möglich, Signalsequenzen direkt bzw. über einen Abstandshalter mit dem Fusionsprotein zu verbinden. Ein Beispiel für eine Signalsequenz ist für Hefezellen die Hefe Invertase Signalsequenz (Moir and Dumais, Gene 56, 1987: 209). Eine Signalsequenz bzw. Signalanteil im Sinne der vorliegenden Erfindung dirigiert in den entsprechenden Expressionssystemen den Transport des Fusionsproteins zur Membran. Die vorliegende Erfindung umfasst daher in einer besonders bevorzugten Ausführungsform Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das erfindungsgemäße rekombinante Fusionsprotein einen Signalanteil enthält, der das erfindungsgemäße Fusionsprotein zur gewünschten Membran eines dafür geeigneten Zellsystems dirigiert. 45

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Zellsysteme besonders geeignet, die keine endogenen Proteasen exprimieren, die die Proteasespaltsequenz des erfindungsgemäßen Fusionsprotein spalten, und die ein Expressieren des Fusionsproteins und eines weiteren Proteins oder Fragments desselben sowie die Assoziation des Fusionsproteins mit Membranen ermöglichen. 50

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Auffindung von Proteasen jeglichen Ursprungs, die membranassoziierte Substrate spalten. Die Proteasen können prokaryontischen, eukaryontischen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sein. Für die Auffindung von therapie relevanten Proteasen in Säugern eignen sich eukaryontischen Expressionssysteme besonders gut. Daher umfasst die vorliegende Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das geeignete Expressionssystem ein eukaryontisches Expressionssystem ist. 60

Ganz besonders bevorzugt sind Hefeexpressionssysteme, da diese einfach handhabbar und oftmals frei von endogenen Säugetierproteasen sind. Zudem stehen eine Vielzahl rekombinanter Werkzeuge für Hefe zur Verfügung. In einer weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Erfindung daher Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das geeignete Expressionssystem ein Hefeexpressionssystem ist. 65

Zur Realisierung der Erfindung sind auch Expressionssysteme aus Säugetierzellen oder transgenen Tieren möglich. Hierbei ist jedoch besonders auf das Vorhandensein und nach Möglichkeit Inaktivieren endogener Proteasen zu achten, die das Verfahren beeinflussen können. Die Erfindung umfasst daher auch Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind,

daß das geeignete Expressionssystem ein Säugerexpressionssystem ist.

- Der Reporteranteil eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins kann jedes beliebige rekombinant exprimierbare Protein oder Peptid sein, dessen Freisetzung vom Fusionsprotein durch proteolytische Spaltung ein nachweisbares Signal auslöst. Zum einen kann der Reporteranteil dann als Protein bzw. Peptid im Zytosol nachgewiesen werden, beispielsweise durch reporterantellspezifische Antikörperbindung im Zytosol nach Abtrennung der Membranfraktion. In Frage kommen aber auch alle Arten löslicher Transkriptionsfaktoren. Die Freisetzung löslicher Transkriptionsfaktoren kann dann nachgeschaltete Signale auslösen. Geeignete transkriptionsregulierende Elemente sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik geläufig und beinhalten Signalmoleküle wie Gal4 (Laughan, A and Gesteland, R Molec. Cell Biol., 4, 1984: 260-267), VP16 (Goff, Stephen P. et al. Current Opinion in Biotechnology, 6, 1995: 59-64) und LexA (siehe Goff et al.).
- Der Transkriptionsaktivator Gal4 eignet sich besonders gut für Hefeexpressionssysteme. Auch verkürzte aktive Formen von Gal4, wie beispielsweise Gal4-1147/768-881 und Gal4-1-238/768-881 (Jun Ma und Mark Ptashne, Cell 48, 1998: 847-853) sind geeignet. Daher umfasst die Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform auch Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Reporteranteil des Fusionsproteins der Hefetranskriptionsaktivator Gal4 ist. Typische Reportergene, die Transkriptionsaktivatoren nachgeschaltet sind, sind CAT (Alton und Vapnek, Nature 282, 1979: 864-869), Luziferase (deWet et al. Mol. Cell. Biol., 7, 1987: 725-737; Engebrecht and Silverman, PNAS 1, 1984: 4154-4158), β -Galactosidase (siehe oben, Goff et al.) und alkalische Phosphatase (Toh et al. Eur. J. Biochem. 182, 1989, 231-238).

- Als Ankeranteil im Sinne der Erfindung kommen alle Peptidsequenzen in Frage, die mit Membranen assoziieren. Hier sei besonders auf die Transmembranregionen membranständiger Proteine verwiesen. Insbesondere eignen sich Transmembranregionen von Typ1 Transmembranregionen. Presenilin (Sherrington et al., Nature 325, 754), z. B. die TM1-Domäne von Presenilin 1, und BAPP (Kang et al., Nature 325 : 733) enthalten bevorzugte Transmembranregionen. Die Erfindung umfasst daher auch Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Ankeranteil des Fusionsproteins die TM1-Domäne von Presenilin 1 ist.

- In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung ein Fusionsprotein, das neben der zu untersuchenden Spaltsequenz als Ankeranteil über die TM1-Domäne von Presenilin 1 verfügt, dessen Reporteranteil der Hefetranskriptionsfaktor Gal4 ist, und das mit einem geeigneten Membransignalanteil verbunden ist.

- Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von Techniken geläufig, die Expression endogener Proteine in Zellsystemen zu inhibieren. Bei Bedarf ist der Fachmann somit in der Lage, systemeigene unerwünschte Proteasen aus geeigneten Expressionssystemen zu entfernen oder zu inaktivieren. Besonders bevorzugt sind Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das geeignete Expressionssystem keine systemeigenen Proteasen enthält, die membranassoziierte Substrate spalten.

- Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich für alle Proteasespaltsequenzen. Ganz besonders bevorzugt sind Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich bei der Proteasespaltsequenz um eine Aminosäuresequenzen handelt, die von mindestens einer der folgenden Proteasen gespalten wird:

- γ -Sekretase (Selkoe, J. Biol.Chem 271, 1996: 18259), NOTCH Protease (Schroeter et al. Nature 393, 1998: 382), Presenilin Protease (Thinakaran et al. Neuron 17, 1998: 181), Caspasen (Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. Trends Biochem. Sci., 22, 1997: 299).

- In einer weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform offenbart die vorliegende Erfindung Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz das humane β amyloid precursor protein (BAPP) oder ein Teil davon ist.

- In einer weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform offenbart die vorliegende Erfindung Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz einer der in den Fig. 5 oder 6 dargestellten Teilsequenzen des humanen β amyloid precursor protein's (BAPP) entspricht.

- Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders geeignet, Proteasen und deren Gene aus Genbibliotheken zu identifizieren. Sobald ein geeignetes Zellsystem mit einem geeigneten rekombinanten Fusionsprotein mit einer festgelegten Proteasespaltsequenz vorliegt, muß nur noch das weitere Gen aus einer zu untersuchenden Genbibliothek im gleichen Expressionssystem exprimiert werden.

- Sobald der Fachmann ein geeignetes Zellsystem mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsprotein etabliert hat, das eine Spaltsequenz von Interesse enthält, muß er nur noch ein weiteres Protein oder Fragment davon aus einer zu untersuchenden Genbibliothek im gleichen Expressionssystem exprimieren, um Proteine oder Teile davon mit entsprechender spezifischer proteolytischer Aktivität in der zu untersuchenden Genbibliothek aufzufinden.

- Ganz besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Verfahren zur Auffindung der γ -Sekretase, oder der Presenilinasen, oder der NOTCH-Protease, oder der Presenilinspaltenden Caspasen aus Genbibliotheken.

- Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die rekombinanten Fusionsproteine, die zur Ausübung der oben beschriebenen Verfahren notwendig sind.

- Solche Fusionsproteine können mit einer zellulären Membran assoziieren und bestehen mindestens aus einem Reporteranteil und einer Proteasespaltsequenz.

- Sollte ein solches rekombinantes Fusionsprotein bestehend aus einem Reporteranteil und einer Proteasespaltsequenz nicht von selbst mit den Membranen des Expressionssystems assoziieren können, so muß ein solches Fusionsprotein einen zusätzlichen Membranankeranteil enthalten.

- Auch kann es vorteilhaft sein, die oben genannten funktionellen Anteile des erfindungsgemäßen Fusionsproteins durch zusätzliche Abstandshalter zu trennen und so den sterischen Freiraum einzelner funktioneller Anteile zu erhöhen oder deren Lokalisation in oder an der Membran zu verändern.

- Desweiteren kann es vorteilhaft sein, dem rekombinanten erfindungsgemäßen Fusionsprotein einen zusätzlichen Signalanteil zum Zweck des zielgerichteten Transports zur Membran eines Expressionssystems hinzuzufügen.

- Als besonders vorteilhafte Ausführungsform hat sich für Hefeexpressionssysteme das Reportermolekül Hefetranskriptionsaktivator Gal4 bewährt.

Eine weitere besonders vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Fusionsproteins enthält als Ankeranteil

die TM1-Domäne von Presenilin 1.

Als Signalanteil in Hefeexpressionssystemen enthält eine besondere Ausführungsform der Erfindung Fusionsproteine deren Signalanteil der Hefe Invertase (siehe oben) entnommen ist.

Als Proteasespaltsequenzen enthalten die erfindungsgemäßen Fusionsproteine in einer ganz besonderen Ausführungsform mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die spezifisch von der γ -Sekretase, oder der Presenilase, oder der NOTCH-Protease, oder den Presenilin-spaltenden Caspasen gespalten werden.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Fusionsprotein als Reporteranteil den Hefetranskriptionsaktivator Gal4, als Ankeranteil die TM1-Domäne von Presenilin 1 und eine vermutete Proteasespaltsequenz.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Fusionsprotein als Reporteranteil den Hefetranskriptionsaktivator Gal4, die TM1-Domäne von Presenilin 1 als Ankeranteil, die Signalsequenz der Hefe Invertase als Signalanteil und eine vermutete Proteasespaltsequenz.

Bevorzugt sind rekombinante erfindungsgemäße Fusionsproteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz das humane β amyloid precursor protein (BAPP) oder ein Teil davon ist.

Besonders bevorzugt sind rekombinante erfindungsgemäße Fusionsproteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Proteasespaltsequenz einer der in den Fig. 5 oder 6 dargestellten Teilsequenzen des humanen β amyloid precursor protein's (BAPP) entspricht.

Ganz besonders bevorzugt sind rekombinante erfindungsgemäße Fusionsproteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es eine Signalsequenz gemäß Fig. 3, eine Proteasespaltsequenz mit Abstandshalter gemäß Fig. 5 und einen Reporteranteil gemäß Fig. 8 enthält.

Ganz besonders bevorzugt sind rekombinante erfindungsgemäße Fusionsproteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es eine Signalsequenz gemäß Fig. 3, eine Proteasespaltsequenz mit Abstandshalter gemäß Fig. 6 und einen Reporteranteil gemäß Fig. 8 enthält.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Fusionsproteine in einem der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren.

Die Erfindung wurde beispielhaft an einem rekombinanten Fusionsprotein (ssTM1Gal4; ss steht für Signalsequenz gemäß Fig. 3, jedoch ohne Methionin am Ende, TM1 steht für die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4, Gal4 steht für die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 8; zwischen TM1 und Gal4 befindet sich der Abstandshalter bzw. die Klonierungsstelle gemäß Fig. 7) gezeigt, bei dem der Transkriptionsaktivator Gal4 Cterminal mit der TM1 Domäne des PS1 Gens verbunden wurde (alle hier verwendeten Gal4-Konstrukte wurden aus pC11 (Fields, S. and Song, O. Nature, 340, 1989: 245) abgeleitet und beinhalten eine Expressionskassette des Gal4-Gens, die unter der Kontrolle der ADH1 Promoter- und Terminatorsequenzen steht. Diese Kassette wurde in YCplac22 (Gietz, R. D. und Sugino, A. Gene, 74, 1988: 527) einkloniert zur Darstellung des parentalen Plasmids für ssTM1Gal4 und dessen Derivativen. Das Fusionsprotein ssTM1Gal4 besteht aus der Signalsequenz der Hefe Invertase (aa1-aa19, Moir, D. T. und Dumais, D. R. Gene, 56, 1987: 209), die an den N-Terminus des humanen PS1 fusioniert wurde, der bis hin zur ersten Transmembrandomäne (aa3-aa101) reicht und an den sich eine 3aa (RPH) Spacerregion, die über die StuI- und NdeI-Restriktionstellen verfügt, sowie Hefe-Gal4 (aa1-aa881) anschließt. SsTM1Gal4 wurde durch PCR-Amplifikation der korrespondierenden cDNA-kodierenden Regionen unter Verwendung von Standardklonierungstechniken hergestellt (Ausubel, F. M. et al. Current Protocols in Molec. Biol. (Greene, New York, 1992). Die Fusionsproteine ssTM1-DEVVG-Gal4 und ssTM1-DEVNG-Gal4 wurden durch Insertion hybridisierter Oligonukleotide, die für DEVVG oder DEVNG kodieren, in StuI und NdeI geschnittene ssTM1Gal4-Konstrukte hergestellt.) Zum Zweck des Dirigierens an Membranen in Hefezellen wurde eine Zielsequenz, nämlich die Signalsequenz der Hefe-Invertase (Dumais und Noir, siehe oben) mit dem N-Terminus der TM1-Domäne verbunden. Nach Expression in SFY526 (es wurden Standardmethoden (Ausubel et al., siehe oben) zur Einführung der Plasmide in den Hefestamm SFY526 verwendet (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can^o, gal4-542, gal180-538, URA3 : Gall-lacZ) (Bartel, P. L. et al. BioTechniques, 14, 1993: 920) sowie zur Herstellung von Proteinextrakten und β -gal Assays) war keine β -Galaktosidaseaktivität detektierbar. Die Expression des gleichen, jedoch löslichen Gal4-Anteils für sich allein führte zu einer starken β -Galaktosidaseaktivität. Nach Fraktionierung der Hefezellen war ssTM1-Gal4 in der Membranfraktion nachweisbar. Die Membranassoziation von ssTM1-Gal4 wurde ferner durch Karbonatextraktion erbracht. Die Karbonatextraktion der Membranfraktion führte nicht zur Freisetzung des Fusionsproteins. SsTM1-Gal4 verhält sich somit wie ein integrales Membranprotein.

Zum Nachweis der Spaltbarkeit von membranassoziierten Proteasespaltsequenzen als Bestandteil von ssTM1-Gal4 wurde ssTM1-DEVVG-Gal4 hergestellt, ein Fusionsprotein, dessen Bestandteile ssTM1 und Gal4 durch die Proteasespaltsequenz DEVVG (Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A., Trends Biochem. Sci., 22, 1997: 299) verbunden sind. DEVVG stellt eine Erkennungsstelle für Caspase-3 dar (Lazebnik, Y. A. et al., Nature 371, 1994: 346); Fernandes-Alnemri, T. et al., J. Biol. Chem. 269, 1994: 30761; Tewari, M. et al., Cell, 81, 1995: 801; Nicholson, D. W. et al., Nature 376, 1995: 37; Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A., Trends Biochem. Sci., 22, 1997: 299). Die Expression von ssTM1-DEVVG-Gal4 in SFY526 Hefezellen bewirkte keine β -Galaktosidaseaktivität. Die Koexpression von humaner Caspase-3 zusammen mit ssTM1-DEVVG-Gal4 in SFY526 Hefezellen bewirkte eine starke β -Galaktosidaseaktivität. Die Gesamt cDNA der humanen Caspase-3 (Fernandes-Alnemri, T. et al., J. Biol. Chem., 269, 1994: 30761; Tewari, M. et al., Cell, 81, 1995: 801; Nicholson, D. W. et al., Nature, 376, 1995: 37) wurde in ein pVT100-U-Derivat (Vernet, T. et al., Gene, 52, 1997: 225) einkloniert, in welchem das URA3-Gen durch das LEU2-Gen ersetzt worden war. In diesem Konstrukt steht die Caspase-3-Expression unter der Kontrolle der ADH1 Promoter- und Terminatorsequenzen. Die Aktivität der Caspase-3-Expression wurde durch Spaltung von in vitro-translatiertem 35S Methionin-radiomarkiertem PARPC (ein Cterminal trankiertes PARP-Derivat) bestätigt mittels eines cytosolischen Extrakts aus Caspase-3 transformierten Hefezellen. Immunoblotting mit anti-Gal4-Antikörpern zeigte, daß ssTM1-DEVVG-Gal4 ohne Koexpression als Gesamtprotein membranbound vorliegt. Die Koexpression mit Caspase-3 führte zu löslichen abgespaltenen Gal4-Anteilen. Auch die 12 kDa Untereinheit der Caspase-3 war nachweisbar.

Zum Nachweis der Spezifität wurde das membranassoziierte Fusionsprotein ssTM1-DEVNG-Gal4 in Hefezellen mit

Caspase-3 koexprimiert. Der Austausch der Aminosäure Aspartat in der ursprünglichen Spaltsequenz gegen Asparagin resultierte in keiner Spaltung des Fusionsproteins und somit in keiner β -Galaktosidaseaktivität. Die oben genannten Versuche demonstrieren deutlich, daß die Expression einer Protease, in diesem Fall humane Caspase-3, effizient die Spaltung erfindungsgemäßer membranassoziierter Fusionsproteine und die Freisetzung der membrangebunden Signalanteile, in diesem Fall des Transkriptionsaktivators Gal4, bewirken kann. Ein solches erfindungsgemäßes Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Konstrukte erweist sich somit als hochspezifisch und sensibel unter in-vivo Bedingungen.

In zwei weiteren spezifischen Ausführungsbeispielen wurden erfindungsgemäße Fusionsproteine ohne Ankeranteil in geeigneten Expressionssystemen hergestellt. Das eine Fusionsprotein, ssMC1-55-Gal4 enthält eine Signalsequenz (ss) gemäß Fig. 3, ein Methionin (M), eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 (C1-55) und den Reporteranteil (Gal4) gemäß Fig. 8. Das andere Fusionsprotein, ssMC1-99-Gal4 enthält eine Signalsequenz (ss) gemäß Fig. 3, ein Methionin (M), die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 5 (C1-99) und den Reporteranteil (Gal4) gemäß Fig. 8. Beide Fusionsproteine assoziieren ohne zusätzlichen Ankeranteil und eignen sich speziell zum Auffinden der γ -Sekretase aus Genbibliotheken, die die Proteasespaltsequenzen in Fig. 5 und 6 spezifisch spaltet.

Legenden zu den Figuren

Fig. 1. Schematische Darstellung des Verfahrens

Fig. 1 beschreibt schematisch die Funktionsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifikation von Proteasen, die membranassoziierte Proteasespaltsequenzen erkennen am Beispiel eines erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsproteins (I + II + III), das ein Signalmolekül (III) und einen Membranankeranteil (I) enthält sowie eine diese funktionellen Anteile verbindende Proteasespaltsequenz (II).

Im Falle der Expression einer vermuteten Protease (V) in einem geeigneten Zellsystem ergeben sich die beiden möglichen Folgen a) oder b) für das Zellsystem.

a) Die vermutete Protease (V) spaltet die vorgegebene Proteasespaltsequenz (II) nicht. Der Signalanteil des Fusionsproteins bleibt mit der Membran verbunden und kann weder direkt cytosolisch nachgewiesen werden noch indirekt durch ein im Zellkern vorhandenes Reportergen (VIA/B), das durch den Signalanteil (III) in seiner Transkription beeinflusst wird. Das Reportergen bleibt unbeeinflusst (VIIA).

b) Die vermutete Protease (V) spaltet die vorgegebene Proteasespaltsequenz (II) und kann nun direkt im Cytosol (VI) nachgewiesen werden beziehungsweise indirekt durch die Beeinflussung der Transkription eines Reportergens (VIB) im Zellkern. Das Reportergen vermittelt nun eine detektierbare Veränderung der Zelle.

Fig. 2. Schematische Darstellung der Wirkungsweise von ssTMI-DEVDG- Gal4

Fig. 2 beschreibt schematisch die Funktionsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifikation von Proteasen. In dieser speziellen Ausführungsform führt die Transformation von CPP32 cDNA zu zwei möglichen Reaktionsfolgen a) oder b) innerhalb des Zellsystems.

a) Die vermutete Protease (V) CPP 32 spaltet die vorgegebene Proteasespaltsequenz (IIa) DEVN nicht (IV). Das rekombinante Fusionsprotein besteht aus dem Transkriptionsaktivator Gal4 (III), der über zwei Abstandshalter (Ia, IIIa) und der Proteasespaltsequenz (IIa) mit einem Membranankeranteil (I) aus der TM1-Domäne von Presinilin I verbunden ist, wobei I zusätzlich einen Signalanteil der Hefe-Invertase enthält. Der Signalanteil des Konstrukts bleibt mit der Membran verbunden und kann weder direkt cytosolisch nachgewiesen werden noch indirekt durch ein im Zellkern vorhandenes Reportergen (Gal1-lacZ). Das Reportergen bleibt unbeeinflusst. Eine Färbung der Kolonien durch β -Galaktosidaseaktivität ist nicht möglich.

b) Die vermutete Protease (V) CPP 32 spaltet (VI) die vorgegebene Proteasespaltsequenz (DEVD, IIb) und gelangt nun durch das Cytosol in den Zellkern (VIB), wo es als Transkriptionsaktivator die Expression der β -Galaktosidase und somit die Blaufärbung der Kolonien ermöglicht (VIIB).

Fig. 3 Signalsequenz (Hefe Suc2p 1-19) plus Methionin

MLLQAFLFLLAGFAAKISA + M

Fig. 4 Abstandshalter und Transmembrandomäne (humanes APP₆₉₅597-651, C1-55)

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKK

Fig. 5 Abstandshalter, Transmembrandomäne und cytosolische Domäne (humanes APP₆₉₅597-695, C1-99)

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKK
QYTSIHGVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

Fig. 6 Abstandshalter und Transmembrandomäne (humanes Presenilin1, Aminosäuren 3-101)

ELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNGRP
 QGNSRQVVEQDEEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVATIK

5

Fig. 7 Abstandshalter mit Klonierungsstelle

RPH

10

Fig. 8 Signal Molekül (Hefe Gal4p 1-881)

MKLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVES
 RLERLEQLFLLIFPRELDMLKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMP
 LTLRQHRISATSSSESSNKGQRQLTVSIDSAAHHDNSTIPLDFMPRDALHGFDWSEE
 DDMSDGLPFLKTDPNNGFFGDGSLLCILRSIGFKPENYTNSNVNRLPTMITDRYTLAS
 RSTTSRLLQSYLNNFHPYCPIVHSPTLMMLYNNQIEIASKDQWQILFNCILAIGAWCIEG
 ESTDIDVFYYQNAKSHLTSKVFESGSIIIVTALHLLSRYTQWRQKTNTSYNFHSFSIRMA
 ISLGLNRDLPSSFSDSSILEQRRRIWWSVYSWEIQLSLLYGRSIQLSQNTISFPSSVDDV
 QRTTTGPTIYHGIIETARLLQVFTKIYELDKTVTAEKSPICAKKCLMICNEIEEVSQAPKF
 LQMDISTTALTNLLKEHPWLSFTRFELKWKQLSLIYVLRDFFTNFTQKKSQLEQDQNDH
 QSYEVKRCSIMLSDAAQRTVMSVSSYMDNHNVTYPFAWNCSYYLFNAVLVPIKTLLSN
 SKSNAENNETAQLLQQINTVLMLLKKLATFKIQTCEKYIQVLEEVCAFPILLSQCAIPLPHI
 SYNNSNGSAIKNIVGSATIAQYPTLPEENVNNISVKYVSPGSVGPSPVPLKSGASFSDL
 VKLLSNRPPSRNSPVTIPRSTPSHRSVTPFLGQQQQLQSLVPLTPSALFGGANFNQSG
 NIADSSLSFTFTNSSNGPNLITTQNSQALSQPIASSNVHDNFMNNEITASKIDDGNNSK
 PLSPGWTDQTAYNAFGITTGMFNTTTMDDVYNLYFDDEDTPPNPKKE

20

25

30

35

40

Beispiele

45

Beispiel 1

Darstellung der membranassoziierten Fusionsproteine ssTMI-Gal4, ssTMI-DEVDG-Gal4, ssTMI-DEVNG-Gal4

Alle Gal4-Fusionsproteine leiten sich von Plasmid pCL1 (S. Fields and O. Song, Nature, 340, 245 (1989)) ab, welches das GAL4 Gen in einer Expressionskassette enthält, die aus dem ADH1 Promoter und dem ADH1 Terminator besteht. Diese Expressionskassette wurde in den Hefeexpressionsvektor Ycplac22 (R. D. Gietz and A. Sugino, Gene, 74, 527 (1988)) kloniert. Das resultierende Konstrukt (Ycplac22::Gal4) ist der Ausgangsvektor für ssTMI-Gal4 und seine Derivate. Das Fusionsprotein ssTMI-Gal4 besteht aus der Signalsequenz der Invertase aus Hefe (As1-As19 (D. T. Moir and D. R. Dumaïs, Gene, 56, 209 (1987))) gefolgt vom N-Terminus von humanem PS1 (bis zur ersten Transmembrandomäne (As3-As101)) gefolgt von einer drei Aminosäure (RPH) langen Abstandsregion, welche Restriktionschnittstellen für StuI und NdeI enthält, gefolgt von Hefe Gal4 (As1-As881). SsTMIGal4 wurde durch PCR Amplifikation der entsprechenden cDNA Regionen mittels Standardklonierungstechniken (F. M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Greene, New York, 1992)) hergestellt. Die Fusionsproteine ssTMI-DEVDG-Gal4 und ssTMI-DEVNG-Gal4 wurden durch Insertion von doppelstängigen Oligonukleotiden, die für die Aminosäuresequenz DEVDG oder DEVNG kodieren, in das mit StuI und NdeI geschnittene ssTMI-Gal4 Konstrukt hergestellt.

50

55

60

Beispiel 2

Nachweis der Membranbindung des membranassoziierten Fusionsproteins ssTMI-Gal4 und ssTMI-DEVDG-Gal4

65

Standardmethoden wurden zur Fraktionierung von Hefezellen verwendet (Guthrie, C. & Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press, San Diego). SsTMI-Gal4 war in der Membranfraktion nachweis-

bar. Die Membranassoziation von ssTM1-Gal4 wurde ferner durch Resistenz gegen alkalische Extraktion nachgewiesen (Y. Fujiki et al., J. Cell Biol., 93, 97 (1982)).

Beispiel 3

Darstellung der humanen Caspase-3

Die cDNA der humanen Caspase-3 (T. Fernandes-Alnemri et al., J Biol Chem. 269, 30761 (1994); M. Tewari et al., Cell 81, 801 (1995); D. W. Nicholson et al., Nature 376, 37 (1995.)) wurde in eine Derivat des Hefeexpressionsvektors pVT100-U (2626; T. Vernet et al., Gene 52, 225 (1997.)) kloniert, in dem das URA3 Gen durch das LEU2 Gen ersetzt wurde. In diesem Konstrukt erfolgt die Expression der Caspase-3 unter der Kontrolle der ADH1 Promoter- und Terminatorsequenzen. Die Caspase-3 wird in Hefezellen in die charakteristischen Untereinheiten des proteolytisch aktiven Enzyms gespalten. Der Mechanismus der Caspase-3-Aktivierung in Hefezellen, die weder Apoptose zeigen noch Caspase-Homologe (The Yeast Genome Directory, A supplement to Nature 387, No. 6632) enthalten, ist nicht bekannt, aber könnte durch Autoaktivierung aufgrund der Überexpression erfolgen.

Beispiel 4

Nachweis der Spaltbarkeit von ssTM1-DEVDG-Gal4 in Caspase-3 exprimierenden SFY526 Hefezellen

Standardmethoden (Guthrie, C. & Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press, San Diego; F. M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology ((Greene, New York, 1992) wurden angewandt um die Expressionsvektoren für Gal4, ssTM1-Gal4, ssTM1-DEVDG-Gal4, ssTM1-DEVNG-Gal4 und Caspase-3 in den Hefestamm SFY526 (MATa, ura3-52, his3-200, ande2-901, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can^o, gal4-542 gal180-538, URA3::Gal1-lacZ) (P. L. Bartel et al., BioTechniques 14, 920 (1993)) einzubringen. Die Preparation von Proteinextrakten und β -gal assays folgte Standardmethoden (Guthrie, C. & Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press, San Diego; F. M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Greene, New York, 1992).

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Identifikation von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - I. ein rekombinantes Fusionsprotein, bestehend aus mindestens einem Reporteranteil und einer Proteasespaltsequenz in einem geeigneten Zellsystem exprimiert wird, das mit einer Membran assoziiert und
 - II. ein weiteres Protein in dem gleichen Zellsystem exprimiert wird, und
 - III. das Vorhandensein des abgespaltenen Reporteranteils nachgewiesen wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz ganz oder teilweise innerhalb der Zellmembran lokalisiert ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz ganz oder teilweise innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert ist.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein durch einen zusätzlichen Ankeranteil in der Membran verankert ist.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein durch die membranassoziierte Proteasespaltsequenz in der Membran verankert ist.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die membranassoziierte Proteasespaltsequenz und/oder der Reporteranteil und/oder der Ankeranteil des Fusionsproteins durch einen Abstandshalter verbunden sind.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das erfindungsgemäße Fusionsprotein einen Signalanteil enthält, der das Fusionsprotein zur Membran eines dafür geeigneten Zellsystems dirigiert.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das geeignete Expressionssystem ein eukaryontisches Expressionssystem ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das geeignete Expressionssystem ein Hefeexpressionssystem ist.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das geeignete Expressionssystem ein Säugerexpressionssystem ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Reporteranteil des Fusionsproteins der Hefetranskriptionsaktivator Gal4 ist.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 und 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Ankeranteil des Fusionsproteins die TM1-Domäne von Presenilin 1 ist.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Spaltsequenz mit einem Ankeranteil gemäß Anspruch 12 und einem Reporteranteil gemäß Anspruch 11 und einem geeigneten Signalanteil verbunden ist.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das geeignete Expressionssystem keine systemeigenen Proteasen enthält, die membranassoziierte Substrate spalten.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Proteasespaltsequenz um eine Aminosäuresequenz handelt, die von der γ -Sekretase, oder von der NOTCH Protease, oder von der Presenilin Protease oder von den Presenilin-spaltenden Caspasen gespalten wird.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz das humane β amyloid precursor protein (BAPP) oder ein Teil davon ist.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz einer der in den Fig. 5 oder 6 dargestellten Teilsequenzen des humanen β amyloid precursor protein's (BAPP) ist.
18. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche zur Auffindung von Proteasen, die membranassoziierte Substrate spalten und deren Gene aus Genbibliotheken. 5
19. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche zur Auffindung der γ -Sekretase, oder der Presenilinase, oder der NOTCH-Protease oder der Presenilinspaltenden Caspasen aus Genbibliotheken.
20. Ein rekombinantes Fusionsprotein, das mit einer zellulären Membran assoziieren kann und mindestens einen Reporteranteil und eine Proteasespaltsequenz enthält. 10
21. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es einen zusätzlichen Membranankeranteil enthält.
22. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich mindestens einen Abstandshalter zwischen den funktionellen Anteilen des Fusionsproteins enthält.
23. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich einen Signalanteil zum Zweck des zielgerichteten Transports zur Membran eines Expressionssystems enthält. 15
24. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Reporteranteil der Hefetranskriptionsaktivator Gal4 ist.
25. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Ankeranteil die TM1-Domäne von Presenilin1 ist. 20
26. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Signalanteil die Signalsequenz der Hefe Invertase ist.
27. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Proteasespaltsequenz mindestens eine der Aminosäuresequenzen enthält, die spezifisch von der γ -Sekretase, oder der NOTCH Protease, oder der Presenilin Protease oder von den Presenilin-spaltenden Caspasen gespalten werden. 25
28. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein als Reporteranteil den Hefetranskriptionsaktivator Gal4, die TM1-Domäne von Presenilin 1 als Ankeranteil, und eine vermutete Proteasespaltsequenz enthält.
29. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß ein zusätzlicher Signalanteil der Signalanteil der Hefe Invertase ist. 30
30. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz das humane β amyloid precursor protein (BAPP) oder ein Teil davon ist.
31. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteasespaltsequenz einer der in den Fig. 5 oder 6 dargestellten Teilsequenzen des humanen β amyloid precursor protein's (BAPP) entspricht. 35
32. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Signalsequenz gemäß Fig. 3, eine Proteasespaltsequenz mit Abstandshalter gemäß Fig. 5 und einen Reporteranteil gemäß Fig. 8 enthält.
32. Ein rekombinantes Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 20 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Signalsequenz gemäß Fig. 3, eine Proteasespaltsequenz mit Abstandshalter gemäß Fig. 6 und einen Reporteranteil gemäß Fig. 8 enthält. 40
33. Verwendung eines Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 18 bis 27 in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17. 45

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

